

AKTIVITÄT DER MIKROSOMALEN AZO- UND NITROREDUKTASE
IN LEBERN UNTERSCHIEDLICH VORBEHANDELTEN RATTEN
UNTER DEM EINFLUSS VON METHÄMOGLOBIN,
METYRAPON UND KOHLENMONOXID

JOHANN HELMUT BONOW

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554418_0082

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Aktivität der mikrosomalen
Azo- und Nitroreduktase in
Lebern unterschiedlich vor-
behandelter Ratten unter dem
Einfluß von Methämoglobin,
Metyrapon und Kohlenmonoxid

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizin
der
Johannes Gutenberg-Universität
Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Johann Helmut Bonow
aus Nordhorn

Mainz 1976

Fachbereichsdekan:

Professor Dr. P. Klein

1. Gutachter:

Professor Dr. G.F. Kahl

2. Gutachter:

Professor Dr. K.J. Netter

Tag der mündlichen Prüfung:

20. Oktober 1976

Gesamtherstellung



DITTERS BÜRODIENST

6501 HEIDESHEIM/RHEIN

AM KAPELLCHEN 1 · RUF 06132 / 57 11



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	1
EINLEITUNG	2
ZIEL DER ARBEIT	8
METHODEN	9
1. Vorbehandlung der Ratten	9
2. Aufbereitung der Lebern, Gewinnung der mikrosomalen Fraktion	9
3. Proteinbestimmung	10
4. Bestimmung der Cytochrome P-450 und b_5	10
5. Bestimmung der Aktivität von Azo- und Nitroreduktase	10
6. Messung des mikrosomalen Sauerstoffverbrauches während der Präinkubation	12
7. Substanzen	12
8. Statistische Auswertung	13
ERGEBNISSE	14
1. Aktivität der Azoreduktase in Gegenwart von Metyrapon und Kohlenmonoxid	14
2. Aktivität der Nitroreduktase in Gegenwart von Metyrapon und Kohlenmonoxid	18
3. Aktivität der Azo- und Nitroreduktase in Gegenwart von Methämoglobin	22
4. Abhängigkeit des mikrosomalen Sauerstoffverbrauches von der Vorbehandlung	24
5. Einfluß von Metyrapon und Kohlenmonoxid auf den mikrosomalen Sauerstoffverbrauch in Gegenwart von Neoprontosil	25
6. Einfluß von Metyrapon und Kohlenmonoxid auf den mikrosomalen Sauerstoffverbrauch in Gegenwart von p-Nitrobenzoesäure	28
7. Einfluß von Methämoglobin auf den mikrosomalen Sauerstoffverbrauch in Gegenwart von Neoprontosil bzw. p-Nitrobenzoesäure	31
DISKUSSION	33
ZUSAMMENFASSUNG	41
LITERATURVERZEICHNIS	43

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

CO	= Kohlenmonoxid
EDTA	= Äthylendiamintetraacetat
FAD	= Flavinadenindinucleotid
FMN	= Flavinmononucleotid
KG	= Körpergewicht
K_M	= Michaelis-Konstante
μM	= mikromolar
mM	= millimolar
3MC	= 3-Methylcholanthren (zur Vorbehandlung)
MP	= Metyrapon
NaCl	= physiologische Kochsalzlösung (zur Vorbehandlung)
NADH	= Nicotinamidadenindinucleotid (reduzierte Form)
NADP	= Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NADPH	= Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduzierte Form)
NP	= Neoprontosil
Öl	= Pflanzenöl (zur Vorbehandlung)
pAB	= para-Aminobenzoessäure
PB	= Phenobarbital (zur Vorbehandlung)
pNB	= para-Nitrobenzoessäure
SA	= Sulfanilamid

E I N L E I T U N G

Nach dem heutigen Stand unseres Wissens sind für den Metabolismus von Fremdstoffen die in den Mikrosomen der Leberzellen lokalisierten Enzymsysteme von besonderer Bedeutung. Diese können sowohl oxidative als auch reduktive Abbauege vermitteln. Folgende oxidative Reaktionen wurden beobachtet:

1. Oxidation von Alkylketten, z.B. die Seitenkettenoxidation von Hexobarbital (Brodie et al., 1958),
2. Oxidation von aromatischen Ringen, z.B. Acetanilid $\rightarrow$ p-Hydroxyacetanilid (Brodie und Axelrod, 1948),
3. Oxidative Desalkylierung als O-Desalkylierung, z.B. Codein $\rightarrow$ Morphin (Mannering et al., 1954; Axelrod, 1955), p-Nitroanisol $\rightarrow$ p-Nitrophenol (Netter, 1960) oder als N-Desalkylierung, z.B. Amidopyrin $\rightarrow$ 4-Amino-Antipyrin (Pechthold, 1964),
4. N-Oxidation, z.B. N,N-Dimethylanilin $\rightarrow$ N,N-Dimethylanilin-N-Oxid (Uehleke et al., 1971),
5. Sulfoxidation, z.B. Chlorpromazin $\rightarrow$ Chlorpromazin-sulfoxid (Gillette u. Kamm, 1960).

Eine entscheidende Funktion kommt in diesen mikrosomalen Enzymsystemen dem Cytochrom P-450 zu (Omura und Sato, 1962). Dieses Hämoprotein verdankt seinen Namen einer im reduzierten Zustand starken Affinität zu Kohlenmonoxid, wobei der entstehende Komplex im Spektrum ein Absorptionsmaximum bei 450 nm zeigt. Dieser Vorgang führt zu einer Inaktivierung des Cytochroms.

Das Cytochrom P-450 ist in der Lage, Substrate zu binden (Imai und Sato, 1966; Remmer et al., 1966), um dann entweder als Endoxidase oder als Elektronendonator ihre oxidative oder reduktive Umwandlung zu vollziehen. Dabei stehen ihm Elektronentransport-

systeme zur Verfügung, von denen die NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase (Strittmatter, 1958) und die NADPH-Cytochrom c-Reduktase (Williams und Kamin, 1962; Phillips und Langdon, 1962) bereits isoliert wurden.

Bei der Bindung von Substraten an das im oxidierten Zustand vorliegende Cytochrom P-450 treten im Differenzspektrum charakteristische Veränderungen auf, die eine Einteilung der Substrate in zwei Gruppen zulassen (Narasimulu et al., 1965; Kemmer et al., 1966; Imai und Sato, 1966; Schenkman et al., 1967). Als Hauptvertreter der "Typ I-Substrate" gilt Hexobarbital, welches bei 320 nm ein Absorptionsmaximum und bei 420-422 nm ein Absorptionsminimum hervorruft. Demgegenüber zeigen "Typ II-Substrate" wie beispielsweise Anilin ein fast spiegelbildliches Verhalten mit einem Gipfel bei 423-430 nm und einem Tal bei 390-405 nm. Beide Substrattypen verhalten sich weiterhin unterschiedlich bezüglich ihrer Wirkung auf die NADPH-abhängige Reduktion des Cytochrom P-450. Diese wird durch Typ I-Substrate beschleunigt, durch Typ II-Substrate dagegen nicht beeinflusst oder sogar gehemmt (Gigon et al., 1969).

Eine zusätzliche Möglichkeit, die mikrosomalen Stoffwechselwege zu typisieren, bietet die unterschiedliche Stimulierbarkeit dieser Reaktionen durch intravitale Vorbehandlung der Versuchstiere mit verschiedenen Fremdstoffen. Innerhalb der großen Zahl der inzwischen bekannten "Enzyminduktoren" können zwei prinzipielle Gruppen unterschieden werden, deren Hauptvertreter das Phenobarbital (Kemmer, 1959) bzw. der polyzyklische Kohlenwasserstoff 3-Methylcholanthren (Conney et al., 1968) sind. Phenobarbital steigert den Umsatz der meisten Substanzen, während 3-MC eine spezifischere induktive Steigerung nur einiger Reaktionenewege zeigt. Unter der Vorbehandlung mit Phenobarbital steigt das mikrosomale Eiweiß um 20 - 40% an (Kemmer und Marker, 1963). 3-MC erhöht dagegen das gesamte Leberprotein (Arcos et al., 1961; Conney, 1967). Betrachtet man die Wirkung der Enzyminduktoren etwas differenzierter, so findet man eine Zunahme des Cytochrom P-450-Gehaltes, bei Phenobarbital schneller und intensiver einsetzend, aber auch nach Absetzen des Induktors früher abklingend.

als bei 3-MC. Mannering et al. (1969) beobachteten, daß durch 3-MC-Vorbehandlung eine besondere Form des Cytochroms induziert wird. Diese als "Cytochrom P-448" oder "Cytochrom P₁-450" bezeichnete Form kann nur noch Typ II-Spektren bilden (Mannering, 1971). Schließlich erhöht die Vorbehandlung mit Enzyminduktoren auch den Gehalt an NADPH-Cytochrom c-Reduktase.

- - -

Reduktive Stoffwechselwege sind phylogenetisch älter als oxidative (Brodie und Maickel, 1962). Man unterscheidet

- a) Azogruppen reduzierende und
- b) Nitrogruppen reduzierende Enzyme.

Erste Untersuchungen über den Abbau eines Arzneimittels durch Reduktion einer Azogruppe gehen auf das Jahr 1935 zurück. Die damals aufgezeigte Spaltung der Azobrücke von Prontosil führte zur Entdeckung von Sulfanilamid, der eigentlich wirksamen Komponente dieses ersten Chemotherapeutikums (Domagk, 1935; Tréfouël et al., 1935).

1944 stellten Elson und Warren anhand einer in vivo-Studie über den Azobenzol-Metabolismus von Ratten bereits erste Spekulationen über die Entstehung einer Hydrazoverbindung (Hydrazobenzol) als möglichen Zwischenschritt der Reaktion an. Zwei Untersuchungen über den reduktiven Abbau von 4-Dimethylaminoazobenzol ("Buttergelb") ergaben erste Anhaltspunkte für die hauptsächlich intramikrosomale Lokalisation des Enzyms, für dessen NADPH-Abhängigkeit sowie für die Beteiligung von FAD als prosthetischer Gruppe (Mueller und Miller, 1949 und 1950). Spätere Arbeiten mit diesen und anderen Farbstoffen (Scharlachrot, Neoprontosil, Orange III und IV, Sunset yellow) verifizierten den bislang hypothetischen Reaktionsablauf über die Zwischenstufe der Hydrazoverbindungen bis zu den primären Aminen als Endprodukt (Fouts et al., 1957), zeigten erneut die NADPH-Abhängigkeit (Fouts et al., 1957) und einen Aktivitätsanstieg nach Zugabe der Flavine FMN, FAD sowie Riboflavin (Zelitch und Ochoa, 1953; Fouts et al., 1957;

Shargel, 1967; Shargel und Mazel, 1968; Ketterer et al., 1970).

Fouts et al. (1957) konnten durch Ausfällen in 50-60%iger Ammoniumsulfatlösung die Nitroreduktase-Aktivität völlig zerstören, einen Teil der Azoreduktase-Aktivität jedoch erhalten und somit qualitative und quantitative Unterschiede der an sich ähnlichen Reduktasen aufzeigen. Außerdem stellten sie eine Hemmung der Azoreduktase durch Sauerstoff fest. Andere Autoren (Hernandez et al., 1967 a) erklärten dies mit einer Rückoxidation der Hydrazo-Zwischenstufe und der Entstehung eines NADPH-Mangels nach wiederholt notwendig werdenden Reduktionsschritten.

Während zunächst eine Azoreduktase-Aktivität vorwiegend im Cytosol ("soluble fraction") gefunden wurde (Fouts et al., 1957), konnte Kamm 1957 auch in den Mikrosomen beträchtliche Mengen des Enzyms nachweisen (Gillette, 1967). Andere in vitro-Befunde über eine Induzierbarkeit der Azoreduktase durch Phenobarbital und Iproniazid (Conney et al., 1960) sowie 3-MC (Mazel und Hernandez, 1967) waren weitere Anhaltspunkte für eine Beteiligung der mikrosomalen Fraktion an der enzymatischen Spaltung von Azogruppen. Hernandez et al. (1967 a) konnten in Rattenlebermikrosomen eine Fähigkeit der NADPH-Cytochrom c-Reduktase zur Azogruppenspaltung nachweisen. Jedoch gelang es ihnen nicht, diesen Anteil von der globalen Aktivität zu trennen. Die partielle Hemmbarkeit des Substratumsatzes durch Kohlenmonoxid in einer nachfolgenden Studie (1967 b) deutete auf eine Beteiligung des Cytochrom P-450 hin. Die gleichen Autoren zeigten ferner einen nichtenzymatischen reduktiven Abbau von Azoverbindungen auf.

Bisher bleibt fraglich, welche Bedeutung der Azoreduktase der mikrosomalen Fraktion in vivo zukommt. Viele wasserlösliche Azofarbstoffe, unter ihnen auch Neoprontosil, werden als ionisierte, polare Verbindungen aus dem Gastrointestinaltrakt nur zu einem Teil resorbiert. Sie werden hauptsächlich durch die intestinale Mikroflora reduziert (Gingell et al., 1971).

Eine erste genauere Untersuchung über die Säugetier-Nitroreduktase wurde 1957 von Fouts und Brodie durchgeführt. Dabei fanden die

Autoren Speziesabhängigkeiten (hohe Aktivitäten bei Maus und Meerschweinchen, zehnfach geringere bei der Ratte) sowie Organunterschiede (den höchsten Substratumsatz wies die Leber auf). Flavine, neben FMN und FAD auch Riboflavin, steigerten die Nitroreduktase und ließen die Beteiligung eines Flavoproteins vermuten. Als Kofaktor war NADPH viermal wirksamer als NADH; reiner Sauerstoff hemmte die Reaktion nahezu vollständig. 60% der Aktivität der Nitroreduktase erhielten die Autoren aus dem Kompartiment des Cytosols, später jedoch konnte der überwiegende Anteil dem mikrosomalen System zugeordnet werden (Fouts, 1961).

Ähnlich der Azoreduktase vollzieht sich auch die enzymatische Nitroreduktion über Zwischenstufen. Durch schrittweisen Abbau entstehen zunächst Nitrosoverbindungen, dann Hydroxylaminverbindungen, schließlich das primäre Amin (Neuberg und Welde, 1914; Uehleke, 1963; Gillette, 1963; Uehleke und Nestel, 1967; Gillette et al., 1968; Kato und Oshima, 1968). Dabei ist der erste Schritt zu den Nitrosoverbindungen geschwindigkeitsbestimmend (Gillette, 1963; Gillette et al., 1968) und läuft etwa viermal langsamer ab als der Rest der Reaktion (Uehleke und Nestel, 1967). Die bereits von Fouts und Brodie (1957) sowie von anderen Autoren (Kato und Oshima, 1968; Kato et al., 1969; Carlson und DuBois, 1970) beschriebene Hemmung der Nitroreduktase durch Sauerstoff wurde, wieder in Analogie zur Azoreduktase, mit einer Reoxidation der Hydroxylamine zu den Nitroso-Verbindungen erklärt (Gillette, 1963), die zu einer Erschöpfung der NADPH-Reserven führe (Kiese, 1965). Gillette et al. (1968) hielten jedoch eine indirekte Hemmung über die Bindung des Sauerstoffs an ein reaktionsvermittelndes, autoxidables Cytochrom für möglich. In ihrer Arbeit wurde anhand von Induktions- und Inhibitionsversuchen eine Korrelation zwischen dem Cytochrom P-450-Gehalt und der Nitroreduktase-Aktivität aufgezeigt und damit die Abhängigkeit der Reaktion von diesem Hämoprotein bewiesen. Deutlicher Anhaltspunkt hierfür war die in dieser sowie in anderen Untersuchungen beobachtete gute Induktion der mikrosomalen Nitroreduktase nach Vorbehandlung mit Phenobarbital (Gillette et al., 1968; Kato und Oshima, 1968; Kato et al., 1969; Carlson und DuBois, 1970), 3-Methylcholanthren (Kato et al., 1969) und DDT (Carlson und DuBois, 1970).

Jedoch muß erwähnt werden, daß durch Feller et al. (1970) eine Reduktion der Nitroverbindung Niridazol zum Hydroxylamino-Derivat auch durch die NADPH-Cytochrom c-Reduktase allein nachgewiesen werden konnte (Gillette, 1971).

Die 1969 von Sasame und Gillette gefundene Hemmung der mikrosomalen Nitroreduktase durch Typ II-Substrate wurde von den Autoren zu einer gleichzeitigen Verlangsamung der Cytochrom P-450-Reduktion in Beziehung gesetzt. Typ I-Substrate verlangsamten die Cytochrom P-450-Reduktion nicht und hatten keinen Einfluß auf den Substratumsatz.

Von der mikrosomalen Nitroreduktase ist ein durch das Cytosol vermittelter Umsatz zu unterscheiden. Er ist nicht NADPH-abhängig (Carlson und DuBois, 1970) und nicht durch Phenobarbital oder DDT-Vorbehandlung induzierbar (Kato und Oshima, 1968; Carlson und DuBois, 1970). Zudem hat er eine geringe Spezifität für die prosthetische Gruppe (Fouts und Brodie, 1957) und weist eine beträchtlich geringere Hemmbarkeit durch Sauerstoff auf (Kato et al., 1969).

Ebenso wie die Azogruppenspaltung ist auch die Nitroreduktion in vivo größtenteils von der intestinalen Mikroflora abhängig (Zachariah und Juchau, 1974). Außerdem spricht gegen eine übertragende Bedeutung der mikrosomalen Nitroreduktase in vivo, wie schon bei der Azoreduktase, die hohe Sauerstoffsensitivität (Gillette, 1971).

Z I E L D E R A R B E I T

Die Aktivitäten der mikrosomalen Azoreduktase und Nitroreduktase werden vergleichend gegenübergestellt. Als Substrate dienen Neoprontosil für die Azo- und para-Nitrobenzoesäure für die Nitroreduktase. Alle Untersuchungen werden sowohl an Kontrollmikrosomen als auch an PB- bzw. 3MC-stimulierten Mikrosomen durchgeführt, und zwar unter folgenden Gesichtspunkten:

1. Es wird der Einfluß von Metyrapon auf die Reduktasen mit und ohne Kohlenmonoxid im Inkubat untersucht.
2. Vorausgegangene Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe haben eine Steigerung oxidativer Stoffwechselwege durch Methämoglobin ergeben. In dieser Arbeit soll der reduktive Stoffwechsel hinsichtlich seiner Beeinflussung durch Methämoglobin untersucht werden.
3. Bei der Inkubation von Mikrosomen mit NADPH findet ein kontinuierlicher Abfall der O_2 -Spannung im Inkubat statt. Er diene bei den obigen Versuchen zur Erlangung der notwendigen Anoxie. In diesem Teil der Arbeit wird die Veränderung des Sauerstoffverbrauchs durch die Substrate und Inhibitoren sowie durch Methämoglobin untersucht.

METHODEN

1. Vorbehandlung der Ratten

Männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht von 150-170 g wurden in vier Gruppen unterschiedlicher Vorbehandlung eingeteilt. Eine Gruppe erhielt an drei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils eine intraperitoneale Injektion von 80 mg/kg KG Phenobarbital-Na in einem Volumen von 0,5 ml/150 g KG physiologischer Kochsalzlösung. Die zweite Gruppe erhielt lediglich die gleiche Menge physiologischer Kochsalzlösung nach demselben Injektionsmodus. Den Tieren der dritten Gruppe wurde in 12stündigem Abstand dreimal 20 mg/kg KG 3-Methylcholanthren, suspendiert in einem Volumen von 0,86 ml/150 g KG Pflanzenöl, intraperitoneal injiziert, und die Gruppe 4 schließlich bekam das Öl allein. Allen Ratten stand Wasser ad libitum zur Verfügung, Altromin^R-Trockenfutter (Fa. Altromin, Lage/Lippe) wurde ihnen zwölf Stunden vor dem Töten entzogen.

2. Aufbereitung der Lebern, Gewinnung der mikrosomalen Fraktion

Das Töten der Tiere erfolgte durch Überstrecken der Halswirbelsäule und Ausbluten durch Eröffnen der Halsgefäße. Über einen in die Pfortader vorgeschobenen Katheter wurde die Leber mit eiskalter physiol. Kochsalzlösung perfundiert, bis sie unter einer zusätzlichen Massage nach ca. 2-3 min. anämisch war. Die Lebern wurden sofort entfernt und in eiskalter physiol. Kochsalzlösung gesammelt. Anschließend wurden sie gewogen und auf das Dreifache ihres Feuchtgewichtes mit Saccharose-Versen-Tris-(SVT)Lösung versetzt (Saccharose 0,25 M, Versen=Titriplex III=Na-EDTA 0,005 M, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan 0,02 M; mittels HCl auf pH 7,4 eingestellt) (Leybold und Staudinger, 1959). Bei einer Temperatur von max. 7° C wurden sie homogenisiert.

Die anschließende Zentrifugation, 15 min. bei 1600 x g und weitere 30 min. bei 9000 x g und 4° C in einer Sorvall-Zentrifuge, Modell RC2-B, führte zur Sedimentation von Zelldetritus, Kerntrümmern

und Mitochondrien. Der Überstand wurde anschließend in einer Beckman-Ultrazentrifuge vom Typ L2 65B bei 105 000 x g und 4° C 60 min. lang zentrifugiert. Das entstandene mikrosomale Sediment wurde in SVT-Lösung resuspendiert und nochmals in derselben Weise in der Beckman-Ultrazentrifuge zentrifugiert. Zuletzt wurde das so gewaschene Sediment erneut mit SVT-Lösung versetzt (Proteinkonzentration dieser Suspension etwa 30-40 mg/ml) und bei -20° C aufbewahrt.

3. Proteinbestimmung

Die Eiweißbestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry et al. (1951). Als Protein-Standard diente Lab-Trol^R (Dade Reagents Inc., USA). Für die Versuche wurden Proteinmengen von jeweils 2,5 mg abpipettiert und erneut bei -20° C eingefroren. Durch dieses Einfrieren von Einzelproben war eine Standardisierung der mikrosomalen Alterung nach dem Auftauen am Versuchstag gewährleistet.

4. Bestimmung der Cytochrome P-450 und b₅

Zur Kontrolle des jeweiligen Induktionserfolges wurden im Anschluß an die Mikrosomenpräparationen quantitative Bestimmungen des Cytochroms P-450 sowie des Cytochroms b₅ durchgeführt. Die Bestimmungen des Cytochroms P-450 erfolgten nach der Methode von Omura und Sato (1964), die Bestimmungen des Cytochroms b₅ nach der Methode von Raw und Mahler (1959).

5. Bestimmung der Aktivität von Azo-und Nitroreduktase

Die Versuche wurden als Einzelansätze durchgeführt, mit einem Ausgangsvolumen von 2,5 ml und folgender Zusammensetzung: Mikrosomale Suspension mit einem Proteingehalt von 2,5 mg (diese Einzelportionen wurden unmittelbar vor Zubereitung der Ansätze ca. 4 min. lang wieder aufgetaut), als Substrat für die Azoreduktase Neoprontosil 0,2 µMole (0,08 mM Endkonzentration), für

die Nitroreduktase p-Nitrobenzoesäure 5,0 μ Mole (2 mM Endkonzentration); $MgCl_2$ 12,5 μ Mole (5 mM); Glucose-6-phosphat 7,25 μ Mole (2,9 mM); Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase 0,675 U (0,27 U/ml); bei einem Teil der Versuche Metyrapon 2,5 μ Mole (1 mM) bzw. Methämoglobin 2mg (0,8 mg/ml) sowie schließlich Sørensen-Phosphat-Puffer 0,067 M, pH 7,4, ad 2,5 ml. Daneben wurden jeweils Leerwerte und Standards (mit Sulfanilamid für die Azoreduktase bzw. p-Aminobenzoessäure für die Nitroreduktase) erstellt, die nicht begast bzw. inkubiert wurden.

Jede zu inkubierende Probe wurde anschließend in einem 15 ml-Erlenmeyer-Kolben 5 min. lang von Stickstoff überstrichen und danach sofort in das Inkubationsgefäß (Fassungsvolumen 1,75 ml) blasenfrei eingebracht. Das Gefäß wurde dicht verschlossen, bis auf eine etwa stecknadelkopfgroße Öffnung, durch die nun die Reaktion durch Einspritzen von 7,5 μ l NADP (0,33 mM Endkonzentration) gestartet wurde. Dieses kleine Volumen blieb bei der Zusammenstellung des 2,5 ml-Ansatzes unberücksichtigt. Die Ansätze der Versuche mit Kohlenmonoxid wurden unmittelbar vor ihrem Einfüllen in das Inkubationsgefäß über eine Pasteur-Pipette 1 min. lang leicht mit CO durchblasen.

Die Präinkubation und die 10minütige Inkubation erfolgten in einem Wasserbad von 37° C unter ständiger Durchmischung des Inkubates mit einem Magnetrührer.

Zur Abstopppung der Reaktion wurde ein Teil des Inkubates (1 ml) in ein gleich großes Volumen 20%iger Trichloressigsäure einpipettiert. Die Leerwerte und Standards wurden entsprechend behandelt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Versuchsreihe in einer Christ-Zentrifuge, Typ JIIKS (Heraeus-Christ GmbH, Osterode/Harz), 10 min. bei ca. 3000 UpM. Der Überstand wurde zur quantitativen Bestimmung der Reaktionsprodukte (Sulfanilamid für die Azoreduktase bzw. p-Aminobenzoessäure für die Nitroreduktase) der Diazotierungsreaktion nach Bratton und Marshall (1939) unterworfen. Die Messung der Diazotierungsprodukte erfolgte an einem Eppendorf-Photometer, Typ 1101 M (Eppendorf Gerätebau Netheler und Hinz GmbH, Hamburg), bei 546 nm für p-Aminobenzoessäure bzw. 578 nm für Sulfanilamid (Lier, 1972).

Zur Ermittlung des nichtenzymatischen Anteils der Azo- bzw. Nitroreduktion wurden zunächst einige Ansätze in Anwesenheit von Sauerstoff inkubiert und diazotiert. Die Mittelwerte der so gemessenen nichtenzymatischen Umsätze wurden dann jeweils von den Aktivitäten der eigentlichen Versuche subtrahiert. Sie betrugen für die Azo- wie für die Nitroreduktion etwa 1/10 der Gesamtumsätze.

6. Messung des mikrosomalen Sauerstoffverbrauches während der Präinkubation

Über eine im Inkubat befindliche und mit einem Verstärker (Fa. Eschweiler, Kiel) verbundene Elektrode konnte der nach Einbringen der NADP-Lösung einsetzende Abfall des Sauerstoffpartialdruckes gemessen und mittels eines Schreibers aufgezeichnet werden. Sobald der O_2 -Partialdruck Null erreicht hatte (Abknicken der Sauerstoffverbrauchskurve), begann die Zeitnahme für die 10-minütige Inkubation.

Die spätere Umrechnung auf den Sauerstoffverbrauch (Nanomole O_2 /mg Prot. x min.) erfolgte über die Formel

$$\text{ml gelöstes Gas/ml Flüssigkeit} = \frac{\alpha \cdot p_{\text{Gas}}}{760}$$

(α ist der Bunsensche Absorptionskoeffizient, für Wasser bei 37° C gilt $\alpha = 0,0238$) (Bartels, 1970).

Die Eichung erfolgte mittels zweier Eichgase.

7. Substanzen

Alle Chemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad. Substanzen folgender Hersteller wurden verwendet:

Reagenzien des SVT-Puffers: Fa. E.Merck, Darmstadt;
Neoprontosil: Sterling-Winthrop Research Institute, USA;

Sulfanilamid: Fa. E. Merck, Darmstadt;
p-Nitrobenzoesäure: Fa. E. Merck, Darmstadt;
p-Aminobenzoesäure: Fa. E. Merck, Darmstadt;
Glucose-6-phosphat: Fa. Boehringer, Mannheim;
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase: Fa. Boehringer, Mannheim;
NADP: Fa. Boehringer, Mannheim;
 $MgCl_2$: Fa. E. Merck, Darmstadt;
Metyrapon: CIBA Pharmaceutical Company, Summit, N.J., USA;
Methämoglobin: Fa. Serva, Heidelberg;
Stickstoff: Fa. Linde, Mainz-Kastel;
Kohlenmonoxid: Messer Griesheim GmbH, Frankfurt/M.;
Trichloressigsäure: Fa. E. Merck, Darmstadt;
Reagenzien zur Diazotierung: Fa. E. Merck, Darmstadt.

8. Statistische Auswertung

Die statistische Verteilung der Einzelwerte in den verschiedenen Versuchsgruppen erfüllte nicht die Voraussetzungen für die Erstellung einer Varianzanalyse. Deshalb wurde das parameterfreie Verfahren nach Kruskal und Wallis (1952) gewählt. Bei dieser Signifikanzprüfung ordnet man die Einzelwerte eines zusammengehörigen Versuches unabhängig von den experimentellen Variablen in den einzelnen Versuchsgruppen lediglich nach der numerischen Größe in einer aufsteigenden Rangordnung an. Dabei bekommt der niedrigste Wert die niedrigste und der höchste Wert die höchste Rangzahl. Für die innerhalb eines Versuches zu vergleichenden Gruppen werden nun die Rangsummen errechnet. Sie sind in den folgenden Tabellen am Rand eingetragen. In der Mitte der Tabellen sind die Differenzen der Rangsummen ohne Berücksichtigung des Vorzeichens aufgeführt. Diese Differenzen liegen den Signifikanzprüfungen zugrunde. Zur Erlangung einer bestimmten Wahrscheinlichkeitsstufe müssen sie von Kruskal und Wallis (1952) tabellarisch erfaßte "kritische Differenzen" erreichen oder überschreiten. Für den Fall, daß von zwei zu vergleichenden Versuchsgruppen die eine als Kontrollgruppe zur zweiten aufgefaßt werden kann, stellten Kruskal und Wallis eine gesonderte Tabelle auf.

ERGEBNISSE

1. Aktivität der Azoreduktase in Gegenwart von Metyrapon und Kohlenmonoxid

Wie aus Abb. 1 ersichtlich, war die Azoreduktase sowohl durch PB-Vorbehandlung als auch durch 3MC-Vorbehandlung fast um den Faktor 2 induzierbar. Tab. 1 zeigt, daß bei der Signifikanzprüfung nach Kruskal und Wallis (1952) die Induktionseffekte mit einem Wahrscheinlichkeitsniveau von $P < 0,01$ statistisch zu verifizieren waren.

Abb. 1: Aktivität der mikrosomalen Azoreduktase in Gegenwart von Metyrapon und Kohlenmonoxid



Mikrosomales Protein (1mg/ml) von mit physiologischer Kochsalzlösung, Phenobarbital, Pflanzenöl bzw. 3-Methylcholanthren vorbehandelten Ratten wurde jeweils mit 0,08 mM Neoprontosil als Substrat in Gegenwart eines NADPH-regenerierenden Systems bei 37° C 10 Minuten lang unter anoxischen Bedingungen inkubiert.

Einige der Ansätze enthielten zusätzlich Metyrapon (1 mM), andere wurden vor der Präinkubation 1 Minute lang mit Kohlenmonoxid begast, ein weiterer Teil erhielt sowohl MP (1 mM) als auch die CO-Begasung.

Die Ergebnisse der Einzelversuche sind als Säulen aufgetragen. Gleiche Buchstaben unter der gleichen Basislinie bezeichnen die Verwendung von Mikrosomen eines gemeinsamen Präparationsdatums sowie die Zugehörigkeit zu einem Versuchstag.

Tabelle 1: Signifikanzprüfung nach Kruskal und Wallis (1952) für die Aktivität der Azoreduktase (Substrat NP 0,08 mM) nach unterschiedlicher Vorbehandlung

	89,5	81,5	259	226
	NaCl	Öl	PB	3MC
89,5 NaCl	1			
81,5 Öl	8	1		
259 PB	169,5**	177,5**	1	
226 3MC	136,5* [⊙]	144,5**	33	-

Die entsprechenden Kontrollen aus den Abbildungen 1 und 3 gingen in die Signifikanzprüfung ein (n=9).

* für $P < 0,05$, ** für $P < 0,01$

Umkreisung der Sternchen bezeichnet das Erreichen eines neuen, höheren Signifikanzniveaus unter der Voraussetzung, daß die eine der beiden verglichenen Versuchsgruppen als Kontrollgruppe zur zweiten aufzufassen ist. Näheres siehe Methoden.

Wie Abb. 1 ferner zu entnehmen ist, wurde die Azoreduktase von PB-Mikrosomen durch Metyrapon nicht gehemmt. Die Aktivität der NaCl-Mikrosomen nahm unter Metyrapon um durchschnittlich etwa 13%,

die der Öl-Mikrosomen um 10% ab. Hingegen sank die Aktivität der Azoreduktase nach 3MC-Vorbehandlung unter Metyrapon im Mittel um etwa 34%. Wie Tab. 2 zeigt, war ein Einfluß von Metyrapon statistisch in keinem Fall zu sichern. Immerhin unterstreichen die auffälligen Unterschiede der Rangsummendifferenzen unter den vier mikrosomalen Chargen den oben erwähnten Eindruck.

Kohlenmonoxid reduzierte den Neoprontosil-Umsatz der NaCl-Mikrosomen um durchschnittlich 75%, Öl-Mikrosomen wurden durch CO um 72%, PB-Mikrosomen um 81% und 3MC-Mikrosomen um 79% inhibiert. Alle CO-Hemmungen waren mit $P < 0,01$ signifikant (Tab. 2). Bei Anwesenheit von Metyrapon blieb die CO-Hemmung der Kontrollmikrosomen und 3MC-Mikrosomen statistisch unverändert. Die Hemmung war bei den PB-Mikrosomen in Gegenwart von Metyrapon jedoch deutlich geringer als die alleinige CO-Hemmung und nach Tab. 2 sogar gegenüber der Kontrollaktivität nicht mehr signifikant.

Tabelle 2: Signifikanzprüfung nach Kruskal und Wallis (1952) für die Aktivität der Azoreduktase (Substrat NP 0,08 mM) unter dem Einfluß von MP, CO sowie MP+CO

<u>NaCl</u>		123	99	32	46
		Ko	MP	CO	MP+CO
123	Ko	-			
99	MP	24	-		
32	CO	91**	67*	-	
46	MP+CO	77**	53	14	-

PE

		108,5	113,5	25	53
		Ko	MP	CO	MP+CO
108,5	Ko	-			
113,5	MP	5	-		
25	CO	83,5**	88,5**	-	
53	MP+CO	55,5	60,5⊕	28	-

81

		124	98	40	38
		Ko	MP	CO	MP+CO
124	Ko	-			
98	MP	26	-		
40	CO	84**	58	-	
38	MP+CO	86**	60⊕	2	-

3MC

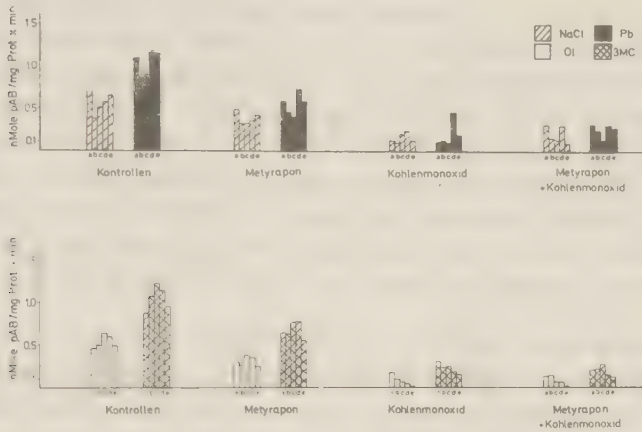
		129	93	38	40
		Ko	MP	CO	MP+CO
129	Ko	-			
93	MP	36			
38	CO	91**	55	-	
40	MP+CO	89**	53	2	-

Der Signifikanzprüfung wurden die in Abb. 1 dokumentierten Ergebnisse unterzogen (n=6). Näheres siehe Methoden.

2. Aktivität der Nitroreduktase in Gegenwart von Metyrapon und Kohlenmonoxid

Nach Abb. 2 zeigte auch die Nitroreduktase eine der Azoreduktase entsprechende Induzierbarkeit durch PB und 3MC. Auch diese Induktionseffekte wiesen eine Wahrscheinlichkeitsstufe von $P < 0,01$ auf (Tab. 3).

Abb. 2: Aktivität der mikrosomalen Nitroreduktase in Gegenwart von Metyrapon und Kohlenmonoxid



Als Substrat diente p-Nitrobenzoesäure (2 mM). Sonstige Einzelheiten sind der Legende zu Abb. 1 zu entnehmen.

Tabelle 3: Signifikanzprüfung nach Kruskal und Wallis (1952) für die Aktivität der Nitroreduktase (Substrat pNB 2 mM) nach unterschiedlicher Vorbehandlung

		77	59	197	195
		NaCl	Öl	PB	3MC
77	3MC	-			
59	Öl	18	-		
197	PB	120**	138**	-	
195	3MC	118**	136**	2	-

Legende zu Tab. 3:

Die entsprechenden Kontrollen aus den Abbildungen 2 und 4 gingen in die Signifikanzprüfung ein (n=8). Näheres siehe Methoden.

Im Gegensatz zur Azoreduktase jedoch blieb die Art der Vorbehandlung bei der Nitroreduktase ohne deutlichen Einfluß auf die Hemmung durch Metyrapon. Sie betrug bei NaCl-Mikrosomen durchschnittlich etwa 30%, bei Öl-Mikrosomen 43%, bei PB-Mikrosomen 46% und bei 3MC-Mikrosomen 35%. Wie Tab. 4 zeigt, erreichten auch bei der Nitroreduktase die Rangsummendifferenzen zwischen den Kontrollaktivitäten und den Metyrapon-gehemmten Umsätzen keinen signifikanten Wert. Allerdings verbleibt ein deutlicher Trend, der bei einer größeren Fallzahl wohl statistisch zu verifizieren wäre.

CO-Begasung senkte die Nitroreduktase-Aktivität von NaCl-Mikrosomen um durchschnittlich etwa 70%, von Öl-Mikrosomen um 84%, von PB-Mikrosomen um 81% und von 3MC-Mikrosomen um 78%. Alle CO-Hemmungen waren mit $P < 0,01$ signifikant (Tab. 4). Metyrapon hatte auf die CO-Hemmung der Nitroreduktase keinen Einfluß. Dies gilt für die Mikrosomen unterschiedlicher Vorbehandlung in gleichem Maße.

Tabelle 4: Signifikanzprüfung nach Kruskal und Wallis (1952) für die Aktivität der Nitroreduktase (Substrat pNB 2 mM) unter dem Einfluß von MP, CO sowie MP+CO

<u>NaCl</u>		88	67	24,5	30,5
		Ko	MP	CO	MP+CO
88	Ko	-			
67	MP	21	-		
24,5	CO	63,5**	42,5	-	
30,5	MP+CO	57,5* [⊙]	36,5	6	-

PB

		90	63	23	34
		Ko	MP	CO	MP+CO
90	Ko	-			
63	MP	27	-		
23	CO	67**	40	-	
34	MP+CO	56* ⁽⁹⁾	29	11	-

Ö1

		90	65	26,5	28,5
		Ko	MP	CO	MP+CO
90	Ko	-			
65	MP	25	-		
26,5	CO	63,5**	38,5	-	
28,5	MP+CO	61,5**	36,5	2	-

3MC

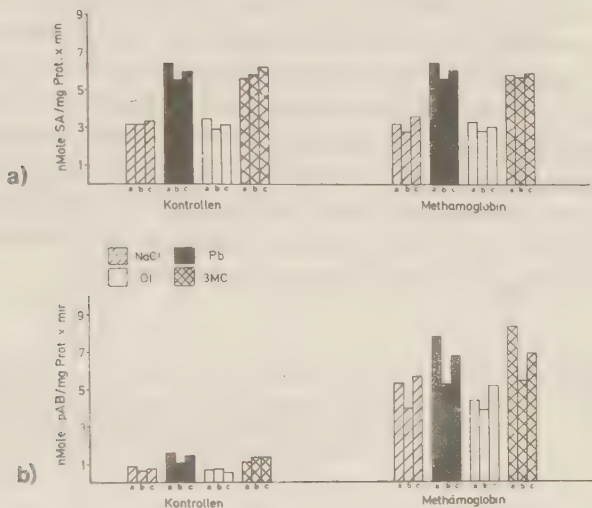
	90 Ko	65 MP	31,5 CO	23,5 MP+CO
90 Ko	-			
65 MP	25	-		
31,5 CO	58,5**	33,5	-	
23,5 MP+CO	66,5**	41,5	8	-

Der Signifikanzprüfung wurden die in Abb. 2 dokumentierten Ergebnisse unterzogen (n=5). Näheres siehe Methoden.

3. Aktivität der Azo- und Nitroreduktase in Gegenwart von Methämoglobin

Abb. 3a zeigt den Einfluß von 0,8 mg/ml Methämoglobin auf den Neoprontosil-Umsatz. Es wird deutlich, daß weder bei unstimulierten noch bei stimulierten Mikrosomen Methämoglobin eine Veränderung der Azoreduktase-Aktivität hervorrufen konnte.

Abb. 3a und b: Aktivität der mikrosomalen Azo- und Nitroreduktase in Gegenwart von Methämoglobin



a) Als Substrat diente Neoprontosil (0,08 mM).

b) Als Substrat diente p-Nitrobenzoesäure (2 mM).

Die angegebenen Umsätze beziehen sich auf mg mikrosomales Protein; die Ansätze mit Methämoglobin enthielten zusätzlich 0,8 mg Methämoglobin pro ml. Die Inkubationsbedingungen und Einzelheiten zur Abbildung sind in der Legende zu Abb. 1 vermerkt.

Vergleicht man hingegen Kontrollaktivitäten der Nitroreduktase mit entsprechenden Werten, die bei Anwesenheit von 0,8 mg/ml Methämoglobin erhalten wurden (Abb. 3b), so findet man eine deutliche Steigerung des pNB-Umsatzes aller mikrosomalen Chargen durch Methämoglobin. Am ausgeprägtesten war der Aktivitätsanstieg der Nitroreduktase von Kontrollmikrosomen mit einer Stimulierung um fast das 7fache. Die Nitroreduktase-Aktivität der induzierten Mikrosomen stieg unter Methämoglobin um das 4,8fache (PB-Mikrosomen) bzw. 5,5fache (3MC-Mikrosomen) an. Wegen der sehr deutlichen Effekte wurde bei diesen Versuchen auf Signifikanzprüfungen verzichtet.

4. Abhängigkeit des mikrosomalen Sauerstoffverbrauches von der Vorbehandlung

Die in den Abbildungen 4, 5 und 6 dargestellten Veränderungen des mikrosomalen Sauerstoffverbrauches in Anwesenheit von NP bzw. pNB unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen lassen einen Anstieg nach PB- und, etwas geringer, 3MC-Vorbehandlung erkennen. Keinesfalls aber erreichte diese Steigerung Ausmaße, wie sie bei der Messung der Enzymaktivitäten als Induktionsfaktoren beschrieben wurden. Dies geht auch aus den Tab. 5 und 6 hervor, die nur in zwei Fällen einen mit $P < 0,05$ signifikanten Anstieg der mikrosomalen Atmung nach Vorbehandlung aufzeigen.

Tabelle 5: Signifikanzprüfung nach Kruskal und Wallis (1952) für den mikrosomalen Sauerstoffverbrauch in Anwesenheit des Substrates NP (0,08 mM) unter dem Einfluß unterschiedlicher Vorbehandlung

	138	104	230	194
	NaCl	Öl	PB	3MC
138 NaCl	-			
104 Öl	34	-		
230 PB	92	126*	-	
194 3MC	56	90	36	-

Die entsprechenden Kontrollen aus den Abbildungen 5 und 7 gingen in die Signifikanzprüfung ein (n=9). Näheres siehe Methoden.

Tabelle 6: Signifikanzprüfung nach Kruskal und Wallis (1957) für den mikrosomalen Sauerstoffverbrauch in Anwesenheit des Substrates pNB (2 mM) unter dem Einfluß unterschiedlicher Vorbehandlung

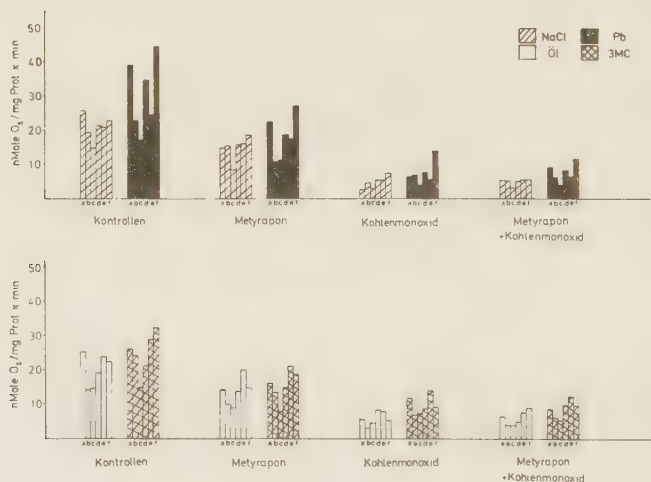
		103 NaCl	87 Öl	161,5 PB	176,5 3MC
103 NaCl	-				
87 Öl	16		-		
161,5 PB	58,5	74,5	-		
176,5 3MC	73,5	89,5 [⊙]	15	-	

Die entsprechenden Kontrollen aus den Abbildungen 6 und 8 gingen in die Signifikanzprüfung ein (n=8). Näheres siehe Methoden.

5. Einfluß von Metyrapon und Kohlenmonoxid auf den mikrosomalen Sauerstoffverbrauch in Gegenwart von Neoprontosil

Wie Abb. 4 zeigt, wurde der mikrosomale Sauerstoffverbrauch bei allen vier Vorbehandlungsarten durch die gleichzeitige Anwesenheit von Metyrapon im Inkubat fast beständig gesenkt, obgleich diese Unterschiede im statistischen Test (Tab. 7) nicht zu sichern waren. Ein noch intensiverer Abfall, jeweils mit einer Wahrscheinlichkeit von $P < 0,01$ (Tab. 7), trat nach CO-Begasung ein. Er wurde durch gleichzeitige Anwesenheit von Metyrapon in CO-begasteten Ansätzen nicht verändert.

Abb. 4: Einfluß von Metyrapon und Kohlenmonoxid auf den mikrosomalen Sauerstoffverbrauch in Gegenwart von Neoprontosil.



Gemessen wurde der Abfall des O₂-Partialdruckes während der Präinkubation in den einzelnen Versuchen in Gegenwart von Metyrapon (1 mM), Kohlenmonoxid sowie MP (1 mM) plus CO. Die Neoprontosil-Konzentration betrug 0,08 mM. Die Ansätze sind identisch mit den in Abb. 1 dargestellten Inkubaten. Einzelheiten hierzu sind der Legende zu Abb. 1 zu entnehmen.

Tabelle 7: Signifikanzprüfung nach Kruskal und Wallis (1952) für den mikrosomalen Sauerstoffverbrauch in Anwesenheit des Substrates NP (0,08 mM) unter dem Einfluß von MP, CO sowie MP+CO

NaCl		124	98	40	38
		Ko	MP	CO	MP+CO
124	Ko	-			
98	MP	26	-		
40	CO	84**	58	-	
38	MP+CO	86**	60*	2	-

PB

	123	95	39,5	42,5
	Ko	MP	CO	MP+CO
123 Ko	-			
95 MP	28	-		
39,5 CO	83,5**	55,5	-	
42,5 MP+CO	80,5**	52,5	3	-

ÖI

	123,5	98,5	39	39
	Ko	MP	CO	MP+CO
123,5 Ko	-			
98,5 MP	25	-		
39 CO	84,5**	59,5	-	
39 MP+CO	84,5**	59,5*	0	-

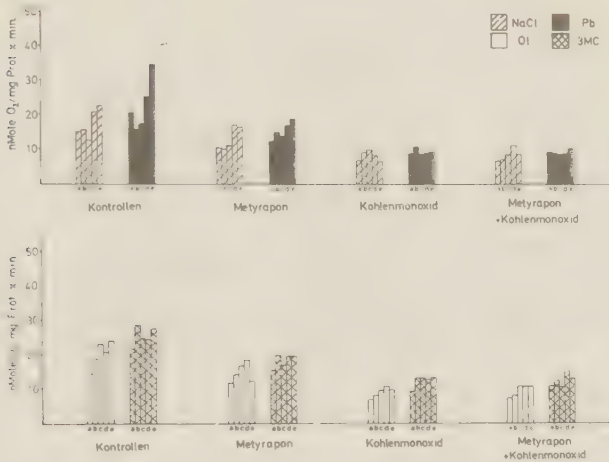
<u>3MC</u>		125,5	87,5	46	41
		Ko	MP	CO	MP+CO
125,5	Ko	-			
87,5	MP	38	-		
46	CO	79,5**	41,5	-	
41	MP+CO	84,5**	46,5	5	-

Der Signifikanzprüfung wurden die in Abb. 5 dokumentierten Ergebnisse unterzogen (n=6). Näheres siehe Methoden.

6. Einfluß von Metyrapon und Kohlenmonoxid auf den mikrosomalen Sauerstoffverbrauch in Gegenwart von p-Nitrobenzoesäure

Gegenüber der Messung des mikrosomalen Sauerstoffverbrauches in Gegenwart von Neoprontosil zeigen die entsprechenden, bei der Nitroreduktase gewonnenen Werte ein ähnliches Bild (Abb. 5). Die Kontrollwerte liegen jeweils im gleichen Bereich und auch die Metyrapon enthaltenden Inkubate ließen eine Hemmung der mikrosomalen Atmung in etwa gleichem Ausmaße erkennen, die nach Tab. 8 statistisch jedoch nicht verifiziert werden konnte. Signifikant niedriger war auch hier der mikrosomale Sauerstoffverbrauch nach CO-Begasung ($P < 0,05$ bzw. $P < 0,01$ in Tab. 8). Zugabe von Metyrapon zu CO-begasteten Ansätzen veränderte diesen Abfall wiederum nicht.

Abb. 5: Einfluß von Metyrapon und Kohlenmonoxid auf den mikrosomalen Sauerstoffverbrauch in Gegenwart von p-Nitrobenzoesäure



Gemessen wurde der Abfall des O₂-Partialdruckes während der Präinkubation in den einzelnen Versuchen in Gegenwart von Metyrapon (1mM), Kohlenmonoxid sowie MP (1 mM) plus CO. Die p-Nitrobenzoesäure-Konzentration betrug 2 mM. Die Ansätze sind identisch mit den in Abb. 2 dargestellten Inkubaten.

Tabelle 8: Signifikanzprüfung nach Kruskal und Wallis (1952) für den mikrosomalen Sauerstoffverbrauch in Anwesenheit des Substrates pNB (2 mM) unter dem Einfluß von MP, CO sowie MP+CO

NaCl	84	69	30,5	26,5
Ko	MP	CO	MP+CO	
84 Ko	1			
69 MP	15	1		
30,5 CO	53,5*	38,5	1	
,5 +CO	57,5*	42,5	4	1

PE

	87	68	31	24
	Ko	MP	CO	MP+CO
87 Ko	-			
68 MP	19	-		
31 CO	56*⊗	37	-	
24 MP+CO	63**	44⊗	7	-

01

	87	68	24	31
	Ko	MP	CO	MP+CO
87 Ko	-			
68 MP	19	-		
24 CO	63**	44	-	
31 MP+CO	56*⊗	37	7	-

3MC

		90	65	30	25
		Ko	MP	CO	MP+CO
90	Ko	-			
65	MP	25	-		
30	CO	60**	35	-	
25	MP+CO	65**	40	5	-

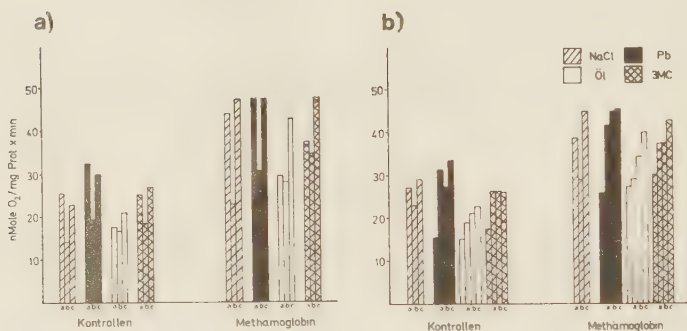
Der Signifikanzprüfung wurden die in Abb. 6 dokumentierten Ergebnisse unterzogen (n=5). Näheres siehe Methoden.

7. Einfluß von Methämoglobin auf den mikrosomalen Sauerstoffverbrauch in Gegenwart von Neoprontosil bzw. p-Nitrobenzoesäure

Nach Abb. 6a und b bewirkte die Zugabe von 0,8 mg/ml Methämoglobin in allen Fällen einen Anstieg der mikrosomalen Respiration. Dieser war in Gegenwart von NP gleich stark wie bei Anwesenheit von pNB und erfolgte jeweils um einen mittleren Faktor kleiner als 2.

Auch bei diesen Versuchen wurde wegen der deutlichen Effekte auf eine statistische Sicherung mittels Erhöhung der Fallzahl verzichtet

Abb. 6 a und b: Einfluß von Methämoglobin auf den mikrosomalen Sauerstoffverbrauch in Gegenwart von Neoprontosil bzw. p-Nitrobenzoesäure



a) Als Substrat diente Neoprontosil (0,08 mM).

b) Als Substrat diente p-Nitrobenzoesäure (2 mM).

Gemessen wurde der Abfall des O₂-Partialdruckes während der Präinkubation in den einzelnen Versuchen in Gegenwart von 0,8 mg Methämoglobin pro ml Inkubat. Er wurde bezogen auf mg mikrosomales Protein. Die Ansätze sind identisch mit den in Abb. 3a bzw. 3b dargestellten Inkubaten.

DISKUSSION

Gegenwärtig bestehen noch Unklarheiten über die Lokalisation und Funktionsweise der Azo- und Nitroreduktase von Säugetieren. Erschwert werden die Untersuchungen hierzu durch unterschiedliche Substratspezifitäten, durch die beträchtliche Hemmung beider Enzymsysteme in Mikrosomen durch Sauerstoff sowie durch die Rolle einer nichtenzymatischen Substratreduktion (Gillette, 1971). Hinzu kommen die Befunde, daß sich die Aktivitäten der Azo- und Nitroreduktase in den einzelnen Leberzellkompartimenten qualitativ und quantitativ unterscheiden (Gillette, 1971; Mitchard, 1971), zum Teil bedingt durch Kontamination mit verschiedenartigen Enzymen, die ihrerseits reduktive Stoffwechselwege katalysieren können (Gillette, 1971). Dies läßt die alleinige Erforschung dieser Reaktionen anhand von ganzen Homogenaten fragwürdig erscheinen (Mitchard, 1971) und macht die gezielte Untersuchung der mikrosomalen Fraktion notwendig.

Auch wenn die meisten in vitro-Untersuchungen für eine überwiegende Rolle der mikrosomalen Reduktasen sprechen, wird doch die Bedeutung dieser Systeme für die Verhältnisse in vivo wegen der bereits oben erwähnten großen Sauerstoff-Sensitivität angezweifelt (Gillette, 1971). Ohnehin deuten einige Studien auf einen entscheidenden Anteil der intestinalen Mikroflora am reduktiven Metabolismus hin (Gingell et al., 1971, Zachariah und Juchau, 1974).

Obwohl die Beteiligung des Cytochrom P-450-Systems sowohl an der mikrosomalen Azoreduktase (Hernandez et al., 1967 b) als auch an der Nitroreduktase (Gillette et al., 1966) inzwischen als gesichert gelten darf, bestehen doch Zweifel an der abschließlichen Rolle dieses Hämoproteins. Erwähnt seien in diesem Zusammenhang die Beobachtungen, daß auch andere Hämoproteine wie zum Beispiel Hämoglobin, Myoglobin, Cytochrom b₅ oder Katalase in sogenannten "Modellsystemen" zusammen mit Flavinen und reduziertem Pyridinnucleotid Nitrogruppen redu-

zieren können (Symms und Juchau, 1974) sowie die Beschränkung der Beteiligung des mikrosomalen Cytochrom P-450-Systems auf den letzten Teilschritt der Nitroreduktion vom Hydroxylamin zum primären Amin aufgrund von Elektronenspin-Resonanz-Studien (Mason und Holtzman, 1975).

Wie bereits oben erwähnt, ist das Erreichen von anoxischen Bedingungen für den Ablauf eines reduktiven Stoffwechsels in der Mikrosomenfraktion eine Voraussetzung. Dies bestätigten synchrone Messungen des Sauerstoffpartialdruckes und der Neoprontosil-Spaltung in diesem Labor (Setia Darma, 1976). Hierbei konnte nachgewiesen werden, daß der Substratumsatz erst zum Zeitpunkt des völligen Verschwindens von freiem Sauerstoff in Gang kam. Eine Eliminierung des Sauerstoffs durch Begasung der Inkubate mit verschiedenen Gasgemischen, wie sie bisher in der Literatur versucht wurde, schien uns keine ausreichende Gewähr für das Vorliegen anoxischer Bedingungen zu sein. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit sämtliche Inkubationen in durch Messung kontrollierter Anoxie durchgeführt.

Die Aktivitäten der Azoreduktase in der vorliegenden Studie lagen in einem Bereich, der im Vergleich mit früheren Befunden aus diesem Labor (Lier, 1972) unter Berücksichtigung der höheren Temperatur von 37° C gegenüber 30° C zu erwarten war. Hernandez et al. (1967 a) erhielten bei einer 25fach höheren Substratkonzentration (2 mM NP) etwa um das Doppelte höhere Neoprontosil-Umsätze. Enzymkinetische Studien zur Neoprontosil-Spaltung in Mikrosomen erbrachten in unserem Labor eine Michaelis-Konstante, die für Kontrollmikrosomen knapp 0,05 mM betrug. Hernandez et al. (1967 a) stellten für eine mit Ammoniumsulfat präzipitierte Azoreduktase eine K_M von 4 mM fest. Diese erheblich unterschiedlichen Michaelis-Konstanten lassen Zweifel an der Identität der von Hernandez et al. und uns bestimmten Azoreduktase aufkommen. Die Verschiedenheit der Reduktasen könnte auch in der weiter unten diskutierten unterschiedlichen CO-Hemmung ihren Ausdruck finden.

Auch das Induktionsmuster der Azoreduktase zeigte gewisse Unterschiede zur Studie von Hernandez et al. (1967 b). Zwar bestand weitgehende Übereinstimmung hinsichtlich der Stimulierbarkeit durch PB (Aktivitätsanstieg auf 189% bei Hernandez et al. und auf 196% der Kontrollaktivität in dieser Arbeit), der Einfluß einer 3MC-Vorbehandlung auf die Azoreduktase jedoch war bei der zitierten Arbeit wesentlich geringer (Aktivitätsanstieg auf 135%), in den vorliegenden Versuchen dagegen kaum niedriger als der Wert nach PB (Aktivitätsanstieg auf 93%). Die Zunahme des Umsatzes durch PB-Vorbehandlung korrelierte bei Hernandez et al. deutlich mit der Steigerung des Cytochrom P-450-Gehaltes und war in vollem Umfang durch CO hemmbar. Die Zunahme der Aktivität nach 3MC-Vorbehandlung konnte jedoch nicht durch die NADPH-Cytochrom c-Reduktase erklärt werden, da diese durch 3MC-Vorbehandlung nicht angestiegen war. Auch die CO-Hemmung erfolgte nicht in einem Ausmaß, das eine entscheidende Beteiligung des Cytochrom P-450 hätte möglich erscheinen lassen. Die Autoren postulierten deshalb einen dritten, durch 3MC-Vorbehandlung induzierten, noch unklaren Reduktionsmechanismus.

Aus den während der vorliegenden Untersuchungen parallel zu jeder Mikrosomenpräparation durchgeführten, hier jedoch nicht dokumentierten Cytochrom P-450-Bestimmungen ließ sich eine allgemeine Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Cytochrom P-450-Gehalt errechnen, sowohl bei Vorbehandlung mit PB als auch mit 3MC. Auch die hier beobachtete, etwa gleich starke Restaktivität der Azoreduktase unstimulierter wie stimulierter Mikrosomen nach CO-Hemmung scheint dafür zu sprechen, daß der Hauptanteil der Reaktion vom Cytochrom P-450 vermittelt wird. CO hemmt das Hämoprotein total und läßt unabhängig vom Vorbehandlungsmodus eine kleine, nicht Cytochrom P-450-bedingte Restaktivität zurück.

Auch im Bezug auf die CO-Hemmung unterscheiden sich die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Ergebnisse von denen von Hernandez et al. (1967 b). Die von den Autoren beschriebenen geringeren Hemmungen (85 bis 84%) könnten als weiterer Hinweis

auf eventuelle qualitative Unterschiede zwischen den von uns bzw. Hernandez et al. gemessenen Aktivitäten gewertet werden. Diesen Zweifel hatten schon die unterschiedlichen Michaelis-Konstanten aufkommen lassen. Andererseits haben Studien von Sasame ergeben (Gillette, 1971), daß das Ausmaß der CO-Hemmung der Neoprontosil-Spaltung von der Substratkonzentration abhängt. Auch hierin könnte eine mögliche Erklärung für die bestehenden Diskrepanzen zu finden sein.

Die Aktivitäten der hier gemessenen Nitroreduktase lagen im Vergleich mit anderen Untersuchungen (Adamson et al., 1965; Gillette et al., 1968; Kato et al., 1969; Juchau und Zachariah, 1975) etwa um einen Faktor von 2 bis 3 niedriger. Der in dieser Arbeit vorgenommene Abzug eines nichtenzymatischen Anteils der Reaktion kann den Unterschied allein nicht erklären. Eine detaillierte Wertung fällt allerdings angesichts der unterschiedlichen Substratkonzentrationen, Kofaktor- und Inkubationsbedingungen schwer. Ferner beziehen einige Autoren (z.B. Adamson et al., 1965; Kato et al., 1969) die gemessenen Substratumsätze auf das Leberfeuchtgewicht. Wegen fehlender Angaben zur Proteinausbeute bei der Mikrosomenpräparation erscheint hier ein sicherer Vergleich mit den vorliegenden Ergebnissen nicht möglich.

Kato et al. (1969) untersuchten die Teilschritte der Reduktion der p-Nitrobenzoesäure zur p-Hydroxylaminobenzoesäure und weiter zur p-Aminobenzoesäure. Unter den einzelnen Versuchsbedingungen prüften sie den Einfluß einer unterschiedlichen Vorbehandlung sowie der Pyridin- und Flavinnucleotide auf den 105 000 x g- Überstand und die mikrosomale Fraktion. Hierbei zeigte sich, daß die Nitroreduktase in Mikrosomen mit NADPH als Kofaktor sowohl durch PB als auch, etwas geringer, durch 3MC deutlich stimulierbar war. Dies stimmt mit der vorliegenden Arbeit überein, in der Induktionsfaktoren von 1,9 für PB- und 2,0 für 3MC-Vorbehandlung ermittelt wurden. Die Hemmung des Enzyms durch Kohlenmonoxid betrug für die einzelnen Mikrosomenpräparationen ohne Berücksichtigung der Vorbehandlung 70

bis 84% und lag damit in dem Bereich, den Gillette et al. (1968) in ihrer Arbeit angegeben hatten: Die Autoren fanden eine 82%ige Hemmung der Nitroreduktase unstimulierter Mikrosomen durch CO. Alle diese Befunde weisen auf einen maßgeblichen Anteil des Cytochrom P-450 an der mikrosomalen Nitroreduktase hin, eine Tatsache, die zum ersten Mal von Gillette et al. (1968) experimentell gesichert werden konnte.

Lier (1972) fand trotz der fehlenden Beeinflussung der PB-stimulierten Azoreduktase durch Metyrapon eine Reaktivierung der CO-gehemmten Ansätze. Dies führte ihn zu der Hypothese, daß Metyrapon zwar an PB-stimuliertes Cytochrom P-450 gebunden wird, dort aber keine "intrinsic activity" im Sinne einer Hemmung der Azoreduktase besitzt. Ein Hinweis auf die Bindung ergab sich aus der partiellen Aufhebung der CO-Hemmung. Dies wies auf einen gemeinsamen Bindungsort der beiden Liganden bei fehlender bzw. stark ausgeprägter inhibitorischer Wirkung hin.

Jones et al. (1974) beobachteten eine Zunahme der Affinität von Metyrapon zum reduzierten Cytochrom P-450 nach Stimulation mit PB, hingegen eine Abnahme nach 3MC. Unter Berücksichtigung dieser Befunde ließe sich ein ausgeprägter Hemmeffekt nach Vorbehandlung der Tiere mit PB erwarten. Im Gegensatz zur erwarteten Rolle der Affinität des Liganden beim inhibitorischen Effekt fand sich jedoch in Übereinstimmung mit den Befunden von Lier bei der Azoreduktase gerade für das affine Cytochrom kein Hemmeffekt von Metyrapon; die Inhibition von Kontrollmikrosomen war geringfügig, diejenige der 3-MC-stimulierten Mikrosomen wies aber trotz der schlechten Affinität mit 34% den stärksten Hemmeffekt von Metyrapon auf. Ein Einfluß der Affinität des Liganden wird möglicherweise jedoch bei der Reaktivierung der CO-gehemmten Reaktion sichtbar. Hier zeigte die Azoreduktase in PB-stimulierten Mikrosomen einen geringeren Hemmeffekt von CO in Gegenwart von Metyrapon, in 3MC-stimulierten wie unstimulierten Mikrosomen wies die CO-Hemmung mit und ohne Metyrapon keinen Unterschied auf. Im Vergleich zu den unterschiedlichen Effekten von Metyrapon auf die Azoreduktase in verschiedenen stimulierten Mikrosomen zeigte Metyrapon im

der Nitroreduktase unabhängig von der Vorbehandlung einen mit 20 bis 46% relativ starken Hemmeffekt. Eine eindeutige Beziehung zwischen der Affinität des reduzierten Cytochroms zum Metyrapon und der inhibitorischen Wirkung läßt sich aus diesen Versuchen nicht ableiten.

Beobachtungen über die Fähigkeit von Hämoproteinen, zusammen mit reduziertem Pyridinnucleotid und Flavinen Nitrogruppen zureduzieren, liegen bereits seit einigen Jahren vor (Symms und Juchau, 1971 und 1972). Die Autoren verglichen die mikrosomale Nitroreduktase mit diesen "Modellsystemen", in denen sie eine Vielzahl von Metalloproteinen, unter anderem auch Methämoglobin, erprobten (Symms und Juchau, 1974). Das Modellsystem mit Methämoglobin erreichte dabei fast 60% des mikrosomalen Kontrollumsatzes. In der vorliegenden Arbeit nun wurden erstmals die Aktivitäten der beiden Reduktasen in Gegenwart von Methämoglobin untersucht. Dabei wurde deutlich, daß die Nitrokörper-Reduktion in beträchtlichem Umfang unter Methämoglobin anstieg (Steigerungsfaktor 4,8 - 6,9), während die Azoreduktase-Aktivität unverändert blieb. Weitere Versuche sind jedoch nötig, um diese Befunde zu erklären. Spektralanalytische Untersuchungen in diesem Labor zeigten, daß während der Präinkubation (Phase des mikrosomalen Sauerstoffverbrauches) das Methämoglobin zu Hämoglobin reduziert wird. Diese Ferroverbindung ist also wohl in einen hypothetischen Interaktionsmechanismus einzubeziehen. Abschließend hierzu sei erwähnt, wie wichtig bei der ausgeprägten Stimulierbarkeit der Nitroreduktase durch Ferri-/Ferrohämoglobin eine sorgfältige Mikrosomenaufbereitung (Perfusion der Lebern in situ, Resuspension und Rezentrifugation des mikrosomalen Sedimentes als zusätzlicher Waschvorgang) ist, um Verunreinigungen mit Hämoglobin möglichst weitgehend zu vermeiden. Bei den meisten der weiter oben zitierten Nitroreduktasestudien wurde bei der Mikrosomenpräparation keine Perfusion der Lebern durchgeführt.

Ein abschließender Teil der vorliegenden Arbeit diente Untersuchungen über den Einfluß der verschiedenen Inkubationsbedingungen auf den mikrosomalen Sauerstoffverbrauch. Die hier vor-

liegenden Daten entstammten den während der einzelnen Präinkubationen durchgeführten Messungen des Sauerstoff-Partialdruckes. Der Sauerstoffverbrauch in NADPH-enhaltenden Mikrosomen-suspensionen konnte bislang noch nicht befriedigend erklärt werden. Schon frühere Untersuchungen (Cooper et al. 1963; Wills, 1969 a-c) ergaben allerdings die Trennung in einen "basalen" Anteil bei Fehlen eines Substrates und einen Sauerstoff-Mehrverbrauch bei Anwesenheit eines hydroxylierbaren Substrates im Inkubat. Als Ursache des basalen Sauerstoffverbrauches sah Wills (1969 a-c) die Bildung von Lipidperoxiden an, der zweite, substratabhängige Teil wurde als Ausdruck der ablaufenden Hydroxylierungsreaktion gedeutet (Cooper et al., 1963).

In dieser Arbeit wurden einige zusätzliche Versuche als Kontrollen ohne Substrat durchgeführt. In den meisten Fällen zeigte sich dabei ein geringer Mehrverbrauch von Sauerstoff in Gegenwart von pNB bzw. NP. Die geringe Zahl dieser Kontrollversuche erlaubt jedoch keine statistischen Aussagen und überläßt die endgültige Klärung der Frage nach der Abhängigkeit der mikrosomalen Respiration von reduzierbaren Substraten somit weiteren Studien.

Untersuchungen über die Wirkung von Metyrapon auf den mikrosomalen Sauerstoffverbrauch liegen bereits vor (Kahl und Netter, 1970; Illing et al., 1974). Metyrapon, in geringerer Konzentration (200 μ M) als der hier verwendeten (1 mM), hemmte den basalen Sauerstoffverbrauch nicht, der Mehrverbrauch bei gleichzeitigem Ablaufen einer Hydroxylierungsreaktion wurde jedoch inhibiert (Kahl und Netter, 1970). Dieser Befund wurde als Hemmung des oxidativen Metabolismus durch kompetitive Bindung von Metyrapon an Cytochrom P-450 gedeutet und sprach nach Meinung der Autoren gleichzeitig gegen einen Hemmechanismus, bei dem Metyrapon an einer Stelle vor der Endoxidase in die Elektronentransportkette eingreift. Spätere synchrone Messungen des Sauerstoff-Partialdruckes und spektralanalytische Substratbindungsstudien (Illing et al., 1974) unterstützten die Hypothese. In diesem Fall hemmte Metyrapon im Sinne einer kompetitiven Inhibition die Bildung einer sauerstoffgebundenen

Zwischenstufe in einem oxidativen Stoffwechselschritt und damit den Anstieg des mikrosomalen Sauerstoffverbrauches.

Auch in der vorliegenden Arbeit bestand eine durchgehende Tendenz der mit Metyrapon inkubierten Ansätze zu niedrigeren Werten. Inwieweit diese jedoch durch eine Interaktion Metyrapon-Cytochrom P-450 bedingt ist, kann nicht mit Sicherheit geklärt werden. In jedem Fall spielt das Hämoprotein für die Beeinflussung des mikrosomalen Sauerstoffverbrauches eine geringere Rolle als für die zuvor besprochenen Aktivitäten der Reduktasen, denn Kontrollversuche ergaben für den mikrosomalen Sauerstoffverbrauch wesentlich schwächer ausgeprägte "Induktionsmuster". Auch Kohlenmonoxid hemmte die mikrosomale Respiration bei weitem nicht so stark wie die Substratumsätze.

Entgegen seiner völlig unterschiedlichen Wirkung auf die Aktivität von Azo- und Nitroreduktase hatte Methämoglobin hinsichtlich des mikrosomalen Sauerstoffverbrauches einen von der Art des Substrates und der Vorbehandlung unabhängigen Einfluß: Es erfolgte in allen Fällen eine etwa gleiche Steigerung um einen Faktor von etwa 2. Hier nicht dokumentierte, bereits oben erwähnte, spektralanalytische Untersuchungen erbrachten den Nachweis, daß während der Präinkubationsphase eine Reduktion der Ferriverbindung zu Hämoglobin stattfindet, welches seinerseits durch seine Oxygenierung die mikrosomale Atmung vermehrt. Ein Versuch, eine exakte stöchiometrische Korrelation beider Vorgänge aufzuzeigen, wurde bisher nicht unternommen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Aktivitäten der mikrosomalen Azo- und Nitroreduktase unterschiedlich vorbehandelter Ratten unter dem Einfluß von Metyrapon (1 mM), Kohlenmonoxid und Methämoglobin (6,8 mg/ml) werden einem Vergleich unterzogen.

Beide Reduktasen können sowohl durch Phenobarbital als auch durch 3-Methylcholanthren um einen Faktor von etwas weniger als 2 induziert werden. Metyrapon hemmt die mikrosomale Nitroreduktase unabhängig von der Art der Vorbehandlung um ca. 30-46%. Die Azoreduktase dagegen wird unterschiedlich beeinflusst: Nach Vorbehandlung mit 3MC erfolgt eine Hemmung von ca. 34%. Umsätze durch Kontrollmikrosomen werden nur um 10-13%, Umsätze durch PB-Mikrosomen dagegen überhaupt nicht inhibiert. Die Schwierigkeiten bei der Einordnung dieser Befunde in die in der Literatur vorliegenden Hypothesen über den Wirkungsmechanismus von Metyrapon werden diskutiert.

Während die mikrosomale Azoreduktase durch Methämoglobin nicht beeinflusst wird, steigert Methämoglobin die Nitroreduktase unstimulierter wie stimulierter Mikrosomen etwa um das 5-7-fache. Angesichts dieser deutlichen Aktivitätszunahme wird auf die Notwendigkeit der Inkubation mit hämoglobinfreien Mikrosomenfraktionen bei Untersuchungen der mikrosomalen Nitroreduktase verwiesen.

Ein zweiter Teil dieser Arbeit gilt der Untersuchung des mikrosomalen Sauerstoffverbrauches in Gegenwart von Neopronazol (0,08 mM) bzw. p-Nitrobenzoesäure (2 mM) unter dem Einfluß von Metyrapon (1 mM), Kohlenmonoxid und Methämoglobin (6,8 mg/ml). Eine Steigerung der mikrosomalen Respiration nach PB- bzw. 3MC-Vorbehandlung erscheint im Vergleich zu der deutlichen Zunahme des Arzneimittelumsatzes nur schwach ausgeprägt, eben-

falls geringer bleibt hier der hemmende Einfluß von Kohlenmonoxid. Metyrapon senkt den mikrosomalen Sauerstoffverbrauch unabhängig von der Art des anwesenden Substrates und der Vorbehandlung. Methämoglobin schließlich steigert die mikrosomale Respiration, ebenfalls unbeeinflußt von den sonstigen Parametern, um einen Faktor von etwas weniger als 2.

Die genannten Effekte auf Arzneimittelmetabolismus und Sauerstoffverbrauch der Mikrosomen sprechen für einen unterschiedlichen Mechanismus bei diesen Interaktionen.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- ADAMSON, R.H., R.L. DIXON, F.L. FRANCIS and D.P. RALL: Comparative biochemistry of drug metabolism by azo and nitro reductase. Proc. natn.Acad.Sci. U.S.A. 54, 1386 (1965)
- ARCOS, J.C., A.H. CONNEY and N.P. BUU-HOI: Induction of microsomal enzyme synthesis by polycyclic aromatic hydrocarbons of different molecular sizes. J. biol. Chem. 236, 1291 (1961)
- AXELROD, J.: The enzymatic conversion of codeine to morphine. J. Pharmacol. exp. Ther. 115, 259 (1955)
- BARTELS, H.: Der Gaswechsel (Atmung). In: Kurzgefaßtes Lehrbuch der Physiologie (Ed.: W.D. KEIDEL), Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1970, p.39
- BRATTON, A.C. and E.K. MARSHALL, Jr.: A new coupling component for sulfanilamide determination. J. biol. Chem. 128, 537 (1939)
- BRODIE, B.B. and J. AXELROD: The fate of acetanilide in man. J. Pharmacol. exp. Ther. 94, 29 (1948)
- BRODIE, B.B. and R.P. MAICKEL: In: Proceedings, First International Pharmacological Meeting 1962 (Eds.: B.B.BRODIE and E.G.ERDOS), vol.6,p.299 Zit. nach MITCHARD, 1971
- BRODIE, B.B., J.R. GILLETTE and B.N. LaDU: Enzymatic metabolism of drugs and other foreign compounds. Ann. Rev. Biochem. 27, 427 (1958)
- BRODIE, B.B., J.J. BURNS, L.C. MARLE, P.A. LIEF, E. BERNSTEIN and E.M. PAPPER: The fate of pentobarbital in man and dog and a method for its estimation in biological materials. J. Pharmacol. exp. Ther. 109, 26 (1953)
- CARLSON, G.P. and K.P. DuBOIS: Studies on the induction of nitroreductase activity by DDT and phenobarbital. Toxicol.Appl.Pharmacol. 17, 203 (1970)
- CONNEY, A.H.: Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. Pharmacol. Rev. 19, 317 (1967)

- CONNEY, A.H., E.C. MILLER and J.A. MILLER: The metabolism of methylated aminoazo dyes. V. Evidence for induction of enzyme synthesis in the rat by 3-methylcholanthrene. *Cancer Res.* 16, 450 (1956)
- CONNEY, A.H., C. DAVISON, R. GASTEL and J.J. BURNS: Adaptive increases in drug metabolizing enzymes induced by phenobarbital and other drugs. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 130, 1 (1960)
- COOPER, D.Y., R.W. ESTABROOK and O. ROSENTHAL: The stoichiometry of C₂₁ hydroxylation of steroids by adrenocortical microsomes. *J. biol. Chem.* 238, 1320 (1963)
- DOMAGK, G.: Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen. *Dtsch. med. Wschr.* 61, 250 (1935)
- ELSON, L.A. and F.L. WARREN: The metabolism of azo compounds. 1. Azobenzene. *Biochem. J.* 38, 217 (1944)
- FOUTS, J.R.: The metabolism of drugs by subfractions of hepatic microsomes. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 6, 373 (1961)
- FOUTS, J.R. and B.B. BRODIE: The enzymatic reduction of chloramphenicol, p-nitrobenzoic acid and other aromatic nitro compounds in mammals. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 119, 197 (1957)
- FOUTS, J.R., J.J. KAMM and B.B. BRODIE: Enzymatic reduction of prontosil and other azo dyes. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 120, 291 (1957)
- GIGON, P.L., T.E. GRAM and J.R. GILLETTE: Studies on the rate of reduction of hepatic microsomal cytochrome P-450 by reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: Effect of drug substrates. *Mol. Pharmacol.* 5, 109 (1969)
- GILLETTE, J.R.: Biochemistry of drug oxidation and reduction by enzymes in hepatic endoplasmic reticulum. *Adv. Pharmac.* 4, 219 (1967)
- GILLETTE, J.R.: Metabolism of drugs and other foreign compounds by enzymatic mechanisms. In: *Fortschr. Arzneimittelforsch.* (Ed.: E. JUCKER), Birkhäuser Verlag Basel und Stuttgart 1963, vol. 6, p. 11

- GILLETTE, J.R.: Reductive Enzymes. In: Handb. Exp. Pharmacol. XXVIII (Eds.: B.B. BRODIE and J.R. GILLETTE), Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1971, p. 349
- GILLETTE, J.R. and J.J. KAMM: The enzymatic formation of sulfoxides: The oxidation of chlorpromazine and 4,4'-diaminodiphenyl sulfide by guinea pig liver microsomes. J. Pharmacol. exp. Ther. 130, 262 (1960)
- GILLETTE, J.R., J.J. KAMM and H.A. SASAME: Mechanism of p-nitrobenzoate reduction in liver: The possible role of cytochrome P-450 in liver microsomes. Mol. Pharmacol. 4, 541 (1968)
- GINGELL, R., J.W. BRIDGES and R.T. WILLIAMS: The role of the gut flora in the metabolism of prontosil and neoprontosil in the rat. Xenobiotica 1, 143 (1971)
- HERNANDEZ, P.H., J.R. GILLETTE and P. MAZEL: Studies on the mechanism of action of mammalian hepatic azoreductase. - I. Azoreductase activity of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate - cytochrome c reductase. Biochem. Pharmacol. 16, 1859 (1967 a)
- HERNANDEZ, P.H., P. MAZEL and J.R. GILLETTE: Studies on the mechanism of action of mammalian hepatic azoreductase. - II. The effects of phenobarbital and 3-methylcholanthrene on carbon monoxide sensitive and insensitive azoreductase activities. Biochem. Pharmacol. 16, 1877 (1967 b)
- ILLING, H.P.A., S. KUNKE and K.J. NETTER: On the spectral intermediate at 440 nm formed during mixed function substrate oxidation. Biochem. Pharmacol. 23, 2603 (1974)
- IMAI, Y. and R. SATO: Substrate interaction with hydroxylase system in liver microsomes. Biochem. biophys. Res. Commun. 22, 620 (1966)
- JONEN, H.G., B. HÜTHWOHL, R. KAHL and G.F. KAHL: Influence of pyridine and some pyridine derivatives on spectral properties of reduced microsomes and on microsomal drug metabolizing activity. Biochem. Pharmacol. 23, 1319 (1974)

- JUCHAU, M.R. and P.K. ZACHARIAH: Comparative studies on the oxidation and reduction of drug substrates in human placental versus rat hepatic microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 24, 227 (1975)
- KAHL, G.F. and K.J. NETTER: The effect of metyrapone on cellular respiration and microsomal drug oxidation. *Biochem. Pharmacol.* 19, 27 (1970)
- KATO, R. and T. OSHIMA: Intracellular localization and co-factor requirement of nitroreductase in rat liver. *Jap. J. Pharmacol.* 18, 196 (1968)
- KATO, R., T. OSHIMA and A. TAKANAKA: Studies on the mechanism of nitro reduction by rat liver. *Mol. Pharmacol.* 5, 487 (1969)
- KETTERER, B., P. ROSS-MANSELL and H. DAVIDSON: The effect of the administration of N,N-dimethyl-4-aminoazobenzene (DAB) on the activity of DAB-reductase and NADPH- cytochrome c reductase. *Chem.-Biol. Interactions* 2, 183 (1970)
- KIESE, M.: Relationship of drug metabolism to methemoglobin formation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 123, 141 (1965)
- KRUSKAL, W.H. and W.A. WALLIS: Use of ranks in one criterion variance analysis. *J. American Statistical Association* 47, 583 (1952)
- LEYBOLD, K. und H.J. STAUDINGER: Geschlechtsunterschiede im Steroidstoffwechsel von Rattenlebermikrosomen. *Biochem. Z.* 331, 389 (1959)
- LIER, A.: Zur Frage der Beeinflussung des oxidativen und reduktiven Fremdstoffumbaus in den Mikrosomen der Rattenleber durch Metyrapon. Medizinische Dissertation, Mainz 1972
- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* 193, 265 (1951)

- MANNERING, G.J.: Properties of cytochrome P-450 as affected by environmental factors: Qualitative changes due to administration of polycyclic hydrocarbons. *Metabolism* 20, 2 (1971)
- MANNERING, G.J., A.C. DIXON, E.M. BAKER and T. ASAMI: The in vivo liberation of morphine from codeine in man. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 111, 142 (1954)
- MANNERING, G.J., N.E. SLADEK, C.J. PARLI and D.W. SHOEMAN: Formation of a new P-450 hemoprotein after treatment of rats with polycyclic hydrocarbons. In: *Microsomes and drug oxidations* (Eds.: J.R. GILLETTE, A.H. CONNEY, G.J. COSMIDES, R.W. ESTABROOK, J.R. FOUTS and G.J. MANNERING), Academic Press, New York and London 1969, p. 333
- MASON, R.P. and J.L. HOLTZMANN: The mechanism of microsomal and mitochondrial nitroreductase. Electron spin resonance evidence for nitroaromatic free radical intermediates. *Biochemistry* 14, 1626 (1975)
- MAZEL, P. and P.H. HERNANDEZ: The effects of phenobarbital and 3-methylcholanthrene on CO sensitive and insensitive azoreductase activities. *Fed. Proc.* 26, 461 (1967)
- MITCHARD, M.: Bioreduction of organic nitrogen. *Xenobiotica* 1, 469 (1971)
- MITOMA, C. and S. UDENFRIEND: Enzymatic hydroxylation of aromatic drugs. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 113, 40 (1955)
- MUELLER, G.C. and J.A. MILLER: The reductive cleavage of 4-dimethylaminoazobenzol by rat liver: The intracellular distribution of the enzyme system and its requirement for TPN. *J. biol. Chem.* 180, 1125 (1949)
- MUELLER, G.C. and J.A. MILLER: The reductive cleavage of 4-dimethylaminoazobenzol by rat liver: Reactivation of carbon dioxide-treated homogenates by riboflavin adenine dinucleotide. *J. biol. Chem.* 185, 145 (1950)
- NARASIMHULU, S., D.M. COOPER and O. ROSENTHAL: Spectrophotometric properties of a tritonclarified steroid 21-hydroxylase system of adrenocortical microsomes. *Life Sci.* 4, 2101 (1965)

- NETTER, K.J.: Eine Methode zur direkten Messung der O-De-methylierung und ihre Anwendung auf die Mikrosomenhemmwirkung von SKF 525-A. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 238, 292 (1960)
- NEUBERG, C. und E. WELDE: Phytochemische Reduktionen. V. Zwischenstufen bei der Umwandlung der Nitrogruppe in die Aminogruppe. Biochem. Z. 67, 18 (1914)
- OMURA, T. and R. SATO: A new cytochrome in liver microsomes. J. biol. Chem. 237, 1375 (1962)
- OMURA, T. and R. SATO: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. J. biol. Chem. 239, 2370 (1964)
- PECHTHOLD, F.: Zur Kenntnis des Abbaues von Dimethylamino-phenyldimethylpyrazolon im Organismus. Arzneimittel-Forsch. 14, 972 (1964)
- PHILLIPS, A.H. and R.G. LANGDON: Hepatic triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase: Isolation, characterization and kinetic studies. J. biol. Chem. 237, 2652 (1962)
- RAW, I. and H.R. MAHLER: Studies of electron transport enzymes. III. Cytochrome b_5 of pig liver mitochondria. J. biol. Chem. 234, 1867 (1959)
- REMMER, H.: Der beschleunigte Abbau von Pharmaka in den Lebermikrosomen unter dem Einfluß von Luminal. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 235, 279 (1959)
- REMMER, H. und H.J. MERKER: Enzyminduktion und Vermehrung von endoplasmatischem Retikulum in der Leberzelle während der Behandlung mit Phenobarbital (Luminal). Klin. Wschr. 41, 276 (1963)
- REMMER, H., J.B. SCHENKMAN, R.W. ESTABROOK, H.A. SASAME, J.R. GILLETTE, D.Y. COOPER, S. NARASIMHULU and O. ROSENTHAL: Drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. Mol. Pharmacol. 2, 187 (1966)

- SASAME, H.A. and J.R. GILLETTE: Studies on the relationship between the effects of various substances on absorption spectrum of cytochrome P-450 and the reduction of p-nitrobenzoate by mouse liver microsomes. *Mol. Pharmacol.* 5, 123 (1969)
- SCHENKMAN, J.B., H. REMMER and R.W. ESTABROOK: Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Mol. Pharmacol.* 3, 113 (1967)
- SETIA DARMA, J.: Untersuchungen zur Charakterisierung der enzymatischen Reduktion von Neoprontosil in Rattenlebermikrosomen. Medizinische Dissertation, Mainz 1976
- SHARGEL, L.: The mechanism of flavin stimulation of microsomal and purified azoreductase. *Fed. Proc.* 26, 461 (1967)
- SHARGEL, L. and P. MAZEL: The effects of flavins on purified and microsomal azoreductase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 12, 317 (1968)
- STRITTMATTER, P.: The interaction of nucleotides with microsomal cytochrome reductase. *J. biol. Chem.* 233, 748 (1958)
- SYMMS, K.G. and M.R. JUCHAU: Mechanisms of aromatic nitro group reduction in the human placenta. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 14, 104 (1971)
- SYMMS, K.G. and M.R. JUCHAU: Mechanism of aromatic nitro group reduction in the soluble fraction of human placenta. *Biochem. Pharmacol.* 21, 2519 (1972)
- SYMMS, K.G. and M.R. JUCHAU: The aniline hydroxylase and nitroreductase activities of partially purified cytochromes P-450 and P-420, and cytochrome b_5 solubilized from rabbit hepatic microsomes. *Drug Metabol. Dispos.* 2, 94 (1974)
- TRÉFOUËL, J., J. TRÉFOUËL, F. NITTI et D. BOVET: Activité du p-aminophénylsulfamide sur les infections streptococciques expérimentales de le souris et du lapin. *C.R. Séanc. Soc. Biol.* 120, 756 (1935)
- UEHLEKE, H.: Nitrosobenzol und Phenylhydroxylase als Zwischenstoffe der biologischen Reduktion von Nitrosobenzol. *Naturwissenschaften* 50, 335 (1963)

- UEHLEKE, H. und K. NESTEL: Hydroxylamino- und Nitrosobiphenyl: Biologische Oxydationsprodukte von 4-Aminobiphenyl und Zwischenprodukte der Reduktion von 4-Nitrobiphenyl. Naunyn-Schiedeborgs Arch. Pharmak. exp. Path. 257, 151 (1967)
- UEHLEKE, H., U. BREYER, B. BUDCZIES, S. TABARELLI und K.H. HELLMER: Der Einfluß von Metyrapon auf verschiedene Typen von mikrosomalen N-Oxidationen. Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem. 352, 403 (1971)
- WILLIAMS, C.H., Jr. and H. KAMIN: Microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase of liver. J. biol. Chem. 237, 587 (1962)
- WILLS, E.D.: Lipid peroxide formation in microsomes. a) General considerations. b) The role of non-haem iron. c) Relationship of hydroxylation to lipid peroxide formation. Biochem. J. 113, 315 (a), 325 (b), 333 (c) (1969)
- ZACHARIAH, P.K. and M. R. JUCHAU: The role of gut flora in the reduction of aromatic nitro groups. Drug Metabol. Dispos. 2, 74 (1974)
- ZELITCH, I. and S. OCHOA: Oxidation and reduction of glycolic and glyoxylic acids in plants. I. Glycolic acid oxidase. J. biol. Chem. 201, 707 (1953)

LEBENS LAUF

Am 18. August 1949 wurde ich als Sohn des Fleischermeisters Werner Bonow und dessen Ehefrau Frida, geborene Hesselink, in Nordhorn/Niedersachsen geboren. Dort wurde ich im Frühjahr 1956 eingeschult. Von 1960 bis zu meinem Abitur (Zeugnis der Reife vom 20. Juni 1968) besuchte ich das Gymnasium in Nordhorn.

Im Wintersemester 1968/69 begann ich mein Medizinstudium an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz und beendete dort am 10. Dezember 1974 die ärztliche Prüfung. Vom 1. März - 15. Oktober 1975 arbeitete ich als Medizinalassistent am Pharmakologischen Institut der Universität Mainz. Nach viermonatiger Ausbildung in der Chirurgischen Klinik des St. Josefs-Hospitals Wiesbaden (1. Januar - 30. April 1976) werde ich vom 15. Mai - 15. September 1976 auf der Inneren Abteilung der Kreis- und Stadtkrankenanstalten Nordhorn als Medizinalassistent tätig sein.

Die Untersuchungen zum Thema dieser Arbeit begann ich im März 1975 am Pharmakologischen Institut der Universität Mainz.



